

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



REC'D 24 SEP 2004

WIPO

PCT

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Aktenzeichen:** 103 35 584.7

**Anmeldetag:** 31. Juli 2003

**Anmelder/Inhaber:** TransMIT Gesellschaft für Technologietransfer mbH,  
35394 Gießen/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur Herstellung zyklischer Moleküle

**IPC:** C 12 P, C 07 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 16. September 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

BEST AVAILABLE COPY



[Zusammenfassung]

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Zyklisierung von Peptiden und Proteinen, bei dem lineare Thioester als Substrate dienen. Die Zyklisierung wird durch Thioesterase-Domänen von NRPS- oder PKS-Zyklasen katalysiert. Die erfindungsgemäßen Substrate bestehen aus einem linearen Peptid, an das eine ladungsstabilisierte aromatische, heteroaromatische oder araliphatische Abgangsgruppe gebunden ist. Diese Substrate führen zu höheren Ausbeuten und Reaktionsgeschwindigkeiten von mit bisherigen Verfahren zyklisierbaren linearen Peptiden und gestatten darüber hinaus auch die Zyklisierung solcher Peptide, die bisher nicht zyklisierbar waren.

An.146/Mar/Sieb

**[Patentanmeldung]****Verfahren zur Herstellung zyklischer Moleküle**

Auf der Suche nach neuen Medikamenten geraten Naturprodukte  
5 zunehmend in den Fokus der Wissenschaft und dienen ihr als  
Leitstruktur für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Diese  
pharmakologisch relevanten Moleküle werden von Bakterien oder  
Pilzen synthetisiert, und ihr Wirkungsspektrum reicht von

- antibiotischen (Infektionskrankheiten) über
- 10 - zytostatischen (Krebs) bis zu
- immunsuppressiven (Organtransplantation) Eigenschaften.

Die Synthese dieser kleinen Moleküle erfolgt in der Natur  
meist an großen Multienzymen, die hauptsächlich Peptide,  
Polyketide oder ein Hybrid aus beiden herstellen. Prominente  
15 Beispiele für solche Verbindungen sind Penicillin, Cepha-  
losporin, Daptomycin, Epothilon und Cyclosporin, die zum Teil  
schon seit langer Zeit erfolgreich in der Medizin eingesetzt  
werden. Eine gemeinsame Eigenschaft dieser Verbindungen ist  
die zyklische Struktur, die für die biologische Aktivität  
20 entscheidend ist. Viele der oben genannten Verbindungen  
besitzen keine oder eine stark verminderte Wirksamkeit, wenn  
sie linear vorliegen. Im Gegensatz zu linearen Molekülen ist  
bei zyklischen Molekülen die konformatorische Flexibilität  
(die freie Bewegung und Rotation) durch den Ringschluss  
25 vermindert, was nur die biologisch aktive Form in Erscheinung  
treten lässt. Die Natur hat hier eine interessante Strategie  
gewählt, die sicherstellt, dass das synthetisierte Molekül in  
nur einer Modifikation vorkommt und daher spezifisch mit nur  
einem „Target“ (Angriffsziel) im biologischen System inter-  
30 agiert. Angriffsziele sind meistens essentielle Bestandteile  
oder Funktionen einer Zelle, die für ihr Überleben wichtig  
sind, wie z.B. die Zellwand oder die Proteinsynthese. Da

An.146/Mar/Sieb

diese Moleküle selektiv bakterielle, fungale oder cancerogene (Krebs-) Zellen bzw. Viren eliminieren und gleichzeitig körpereigenes Zellgewebe verschonen, sind sie in der Therapie von Infektionskrankheiten und Krebs von enormer Bedeutung.

- 5 Daneben können sie auch die von T-Zellen verursachte Immunabwehr unterdrücken, was die Organabstoßung bei Transplantationen wirksam verhindert (Cyclosporin).

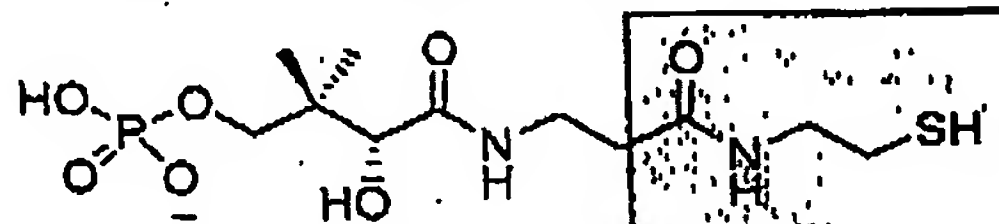
Durch den intensiven Einsatz in der Medizin haben aber leider viele dieser Verbindungen ihre Wirksamkeit verloren, da die  
10 zu bekämpfenden Systeme Resistenzmechanismen entwickelt haben. Darüber hinaus besitzen viele potente Wirkstoffe sehr starke Nebenwirkungen, was ihren medizinischen Einsatz einschränkt (z.B. Nierentoxizität von Bacitracin). Daher besteht ein großer Bedarf an neuen bzw. optimierten Chemotherapeutika  
15 (Antibiotika, Cytostatika und Immunsuppressiva), die möglichst wenige Nebenwirkungen aufweisen und hoch spezifisch mit ihrem „Target“ interagieren. Für die Identifizierung solcher neuen Wirkstoffe können die bereits bekannten, potenten zyklischen Naturprodukte als Leitstruktur dienen und  
20 systematisch verändert und auf verbesserte Wirksamkeit getestet werden.

Derartige Naturstoffe werden im biologischen System von nicht ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) hergestellt und von sogenannten Thioesterasen/Zyklasen zyklisiert, die sich in  
25 guter Ausbeute rekombinant *in vitro* überproduzieren lassen. Diese Enzyme können zuverlässig und effizient lineare Peptide einer bestimmten Leitstruktur in zyklische Moleküle überführen. Die Triebkraft der Zyklisierungsreaktion im natürlichen System ist die Aktivierung des C-Terminus (d. h. der freien  
30 Carbonsäure des linearen Peptids) durch eine Thioesterabgangsgruppe, dem Kofaktor Phosphopantethein. Im artifiziellen System wird die rekombinante Zyklase mit einem verkürzten Thioester-Mimic dieses natürlichen Kofaktors umgesetzt (N-

An.146/Mar/Sieb

Acetylcysteamin, SNAC). Unter verkürzten Thioester-Mimics sind dabei Substanzen zu verstehen, die

- die Funktion des natürlichen Kofaktors imitieren, aber nicht natürlichen Ursprungs sind,
- 5 - eine Thio-Abgangsgruppe besitzen und deren aliphatische Kette kürzer ist als die des natürlichen Kofaktors Phosphopantethein.



Phosphopantethein und SNAC (markiert)

10

Mit der SNAC-Abgangsgruppe konnten bisher die Tyrocidin- und Surfactin- Zyklasten charakterisiert werden. Viele andere biologisch relevante zyklische Verbindungen, wie z.B. Fengycin, Mycosubtilin, Syringomycin und Bacitracin zeigen bei

- 15 Verwendung der SNAC-Abgangsgruppe keine Zyklisierungsaktivität mit dem jeweiligen Enzym, was mit einer inkorrekten Faltung des Enzyms erklärt wird. Andere Verbindungen, wie z.B. CDA (Calcium dependent antibiotic) und Bacillibactin zeigen zum Teil sehr schlechten Umsatz mit den bekannten
- 20 Substratanaloga.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind nicht natürliche, synthetische Kofaktoren, deren chemische Abgangsgruppenqualitäten für eine effiziente Enzymacylierung sorgen. Entgegen

25 der allgemein in der Fachwelt verbreiteten Annahme findet keine „Erkennung“ des natürlichen Kofaktors Panthethein durch das Enzym statt, weshalb einzig das chemische Übertragungspotenzial des Acylrestes auf das aktive Zentrum im Enzym die

30 entscheidende Größe ist. Die in der Fachwelt verbreitete Annahme, die „Erkennung“ des natürlichen Kofaktors Panthethein durch das Enzym sei der Ausschlag gebende Faktor für

An.146/Mar/Sieb



die Zyklisierungsreaktion, ist beispielsweise dargestellt in JW Trauger, RM Kohli, HD Mootz, MA Marahiel and CT Walsh, *Nature* 2000, 407: 215-218; R Aggarwal, P Caffrey, PF Leadly, CJ Smith and J Staunton, *Journal of the Chemical Society*

5 *Communications* 1995, 15: 1519-1520 sowie RS Gokhale, D Hunziker, DE Cane and C Khosla, *Chemical Biology* 1999, 6: 117-125.

Im Gegensatz zu den etablierten SNAC-Substraten weist z.B. Thiophenol als erfindungsgemäße ladungsstabilisierte Abgangs-  
 10 gruppe keinerlei strukturelle Ähnlichkeit mit dem natürlichen Kofaktor auf, besitzt aber eine deutlich bessere Abgangsgruppenqualität, da sich das Thiol in Konjugation mit einem aromatischen Benzolring befindet. Bei anderen erfindungsgemäßen Abgangsgruppen befindet sich die Thiol- oder Hydroxyfunktion an einem  $sp^3$ -Kohlenstoffatom, das direkt an den aromatischen Ring gebunden ist ( $\alpha$ -C-Atom), so dass das aromatische System einen induktiven Effekt auf die Thio- oder Hydroxygruppe ausübt. Derartige erfindungsgemäße Abgangsgruppen werden nachfolgend als araliphatische Thio- oder Hydroxy-  
 15 Abgangsgruppen bezeichnet. Dem Fachmann ist bekannt, dass sich der induktive Effekt eines aromatisches System stabilisierend auf die an ein  $\alpha$ -C-Atom gebundenen Gruppen auswirkt und damit ihre Abgangsgruppenqualität erhöht. Dies kann z.B. in Michael B. Smith & Jerry March: *March's Advanced Organic*  
 25 *Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure. 5th Edition* 2000, John Wiley & Sons Inc., New York / Chichester / Brisbane / Toronto / Singapore nachgeschlagen werden. Im Falle des SNACs ist weder eine Konjugation mit einem aromatischen oder heteroaromatischen System noch eine Stabilisierung durch den  
 30 induktiven Effekt eines aromatischen Systems in  $\alpha$ -Stellung zum Kohlenstoffatom, an das die Thiogruppe gebunden ist, vorhanden, weshalb viele Enzyme keine Aktivität mit diesen Substraten zeigen oder niedrige  $k_{cat}/K_M$  Werte aufweisen.

An.146/Mar/Sieb

**[Beschreibung und Stand der Technik]**

Viele wertvolle Pharmazeutika besitzen zyklische Strukturen, wobei die Ringe dieser zyklischen Strukturen aus 5 oder mehr Atomen gebildet sind. Die aus dem Stand der Technik bekannten Methoden der synthetischen Chemie zur Darstellung zyklischer Verbindungen weisen zahlreiche Nachteile auf. Zu diesen Nachteilen gehören beispielsweise, aber nicht ausschließlich, geringe Ausbeuten der zyklischen Produkte, die Notwendigkeit von Schutzgruppen, um reaktive funktionelle Gruppen zu blockieren oder zu schützen, sowie die Notwendigkeit, diese Reaktionen in organischen Lösungsmitteln durchzuführen. Diese synthetischen Probleme können durch enzymatische Verfahren überwunden werden.

Die EP 0 832 096 B1 beschreibt ein Verfahren, mit dem ein nicht oxidiertes N-terminales Cystein eines ersten Oligopeptids mit dem C-terminalen Thioester eines zweiten Oligopeptids umgesetzt wird. Die Reaktion wird durch ein Thiol katalysiert, wobei die Thiogruppe direkt an einen aromatischen oder heteroaromatischen Ring gebunden ist. Dabei bildet sich ein  $\beta$ -Aminothioester als Zwischenprodukt, der sich spontan intramolekular umlagert, wobei die Amidbindung des Ligationsproduktes der beiden Oligopeptide entsteht. Nachteilig bei diesem Verfahren ist, dass das erste Oligopeptid zwingend ein N-terminales Cystein besitzen muss und dass es nicht für Zyklisierungsreaktionen geeignet ist.

Dagegen beschreibt die US 6,307,018 B1 eine allgemeine Methode, um ein erstes C-terminales  $\alpha$ -Thioesterpeptid mit einem zweiten N-terminalen Aminosäure-Peptidsegment zu verbinden, bei der das N-terminale Aminosäure-Peptidsegment kein N-terminales Cystein besitzen muss. Allerdings muss das zweite Oligopeptid eine sekundäre Aminogruppe aufweisen, die über das N-Atom dieser sekundären Aminogruppe an eine nicht oxidierte Sulfhydrylgruppe eines aromatischen Thiols gebunden ist. Bei dem aromatischen Thiol kann es sich um Thiophenol,

An.146/Mar/Sieb

Benzylmercaptan oder ein S-Alkylbenzylmercaptan handeln.  
Darüberhinaus ist bei der US 6,307,018 B1 nachteilig, dass  
entweder der C-Terminus des ersten oder der N-Terminus des  
zweiten Oligopeptids Glycin sein muss. Die Methode ist nicht  
5 für die Zyklisierung von Peptiden geeignet.  
Die US 2002/0192773 A1 beschreibt ein Verfahren zur enzymati-  
schen Herstellung makrozyklischer Moleküle, bei dem rekombi-  
nante Thioesterase-Domänen (TE-Domänen, Zyklasen) aus einem  
PKS- oder NRPS-Multidomänensystem mit einem Substrat umge-  
10 setzt werden, wobei das Substrat einen über eine Thioesterab-  
gangsgruppe aktivierten Acylrest und ein anhängendes Nucle-  
ophil enthält. Aktivierter Acylrest und Nucleophil sind über  
ein lineares Rückgrat voneinander getrennt. Nachteilig hier-  
bei ist, dass die Abgangsgruppe nicht ladungsstabilisiert  
15 ist.

Durch eine unzureichende Zyklisierungsaktivität vieler Enzyme  
bei Verwendung strukturell analoger Abgangsgruppen zum natür-  
lichen Kofaktor wie beispielsweise Coenzym A, Phosphopan-  
20 tethein und N-Acylcysteamin sind TE-Domänen in ihrer Anwen-  
dung jedoch stark limitiert. Die vorliegende Erfindung über-  
windet durch den Einsatz neuartiger Abgangsgruppen diese  
Einschränkung und ermöglicht nun die Erstellung von diversen  
zyklischen Wirkstoffbibliotheken vieler pharmakologisch  
25 bedeutender Molekülklassen.

Überraschend und im Widerspruch zum Stand der Technik wurde  
gefunden, dass die Erkennung der Substrate durch Enzyme bei  
der Zyklisierung von Peptiden und Proteinen keine Rolle  
spielt und dass ladungsstabilisierte Thio- und Hydroxyverbin-  
30 dungen gute Abgangsgruppen für die Acylierungsreaktion von  
Peptidzyklasen darstellen. Unter ladungsstabilisierten Thio-  
und Hydroxyverbindungen werden dabei aromatische oder hetero-  
aromatische Ringsysteme verstanden, bei denen eine Hydroxy-

An.146/Mar/Sieb



oder Thiogruppe an eines der Ringatome oder an ein an das Ringsystem gebundenes Kohlenstoffatom gebunden ist.

Die vorliegende Erfindung stellt Substrate bereit, mit deren Hilfe die enzymatische Zyklisierung von solchen Peptiden und Proteinen möglich ist, die nach dem Stand der Technik nicht der Zyklisierung zugänglich waren. Des weiteren kann die Ausbeute von Proteinen und Peptiden, die mit Methoden des Standes der Technik zyklisiert werden können, mit Hilfe der erfindungsgemäßen Substrate gesteigert werden. Darüber hinaus liefert die vorliegende Erfindung ein Verfahren, um weitere an der Zyklisierung von Peptiden und Proteinen beteiligte Substrate chemisch zu verändern und damit der Zyklisierung leichter zugänglich zu machen.

15

#### [Aufgabe der Erfindung]

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, das Verfahren zur Darstellung zyklischer Peptide durch Umsetzung linearer Peptide mit Peptidzyklasen zu verbessern, wobei unter Verbesserung eine Erhöhung der Ausbeute an zyklischem Peptid und / oder eine Beschleunigung der Zyklisierungsreaktion und / oder eine Zyklisierung von mit bisherigen Verfahren nicht zyklisierbaren Peptiden verstanden wird. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Bereitstellung eines Verfahrens mittels Substraten in Form linearer Peptide, wobei diese linearen Peptide ladungsstabilisierte Abgangsgruppen besitzen und das Zentrum von Peptidzyklasen selektiv acylieren. Unter „Substraten“ werden hierbei lineare Peptide verstanden, an die eine nucleophile, ladungsstabilisierte erfindungsgemäße Abgangsgruppe chemisch gebunden ist. Unter ladungsstabilisierten Thio- und Hydroxyverbindungen werden dabei aromatische oder heteroaromatische Ringsysteme verstanden, bei denen eine Hydroxy- oder Thiogruppe an eines der Ringatome gebunden ist oder an ein Kohlenstoffatom, welches mit dem Ringsystem

An.146/Mar/Sieb

verbunden ist, wobei die chemische Struktur des aromatischen oder heteroaromatischen Systems so gewählt ist, dass eine an der Thio- oder Hydroxygruppe auftretende negative Ladung stabilisiert wird. Das erfindungsgemäße Verfahren führt zu höheren Ausbeuten an zyklischen Peptiden und / oder verbessert ihre Ausbeute und ermöglicht es erstmalig, auch Peptide wie Fengycin, Mycosubtilin, Syringomycin und Bacitracin zu zyklisieren, die mit den Methoden des Standes der Technik nicht zyklisierbar sind.

10

Die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Substrate erfolgt durch die Synthese des linearen Peptids mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Standardmethoden der Festphasenpeptidsynthese, darauf folgende Kupplung der freien Carbonsäure des linearen Peptids (freie Peptidsäure) an die erfindungsgemäße Thiol- oder Hydroxy-Abgangsgruppe, optionale Reinigung des so erhaltenen erfindungsgemäßen Substrates, darauf folgende Umsetzung des so erhaltenen erfindungsgemäßen Substrates mit einer Peptid-Zyklase und Reinigung des auf diese Weise erhaltenen zyklischen Peptids.

Dazu werden 1 Äquivalent (eq) der freien Peptidsäure mit 2 eq Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), 2 eq N-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 10 eq der jeweiligen Abgangsgruppe versetzt und in THF für 30 min gerührt. Nach Zugabe von 0,5 eq Kaliumkarbonat wird die Reaktion für weitere 2,5 h agitiert und darauf filtriert, um ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff (DCH) abzutrennen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Peptid mit 95 % Trifluoressigsäure (TFA), 2,5 % Wasser und 2,5 % Triisopropylsilan für 3 h entschützt. Das Reaktionsgemisch wird darauf in eiskalten Diethylether gegeben, worauf das Substrat präzipitiert. Dieser Schritt stellt eine Reinigung dar, bei der Reaktionsnebenprodukte abgetrennt werden, und führt zu einer Reinheit des Substrates

An.146/Mar/Sieb

von bis zu 80%, was im Allgemeinen für die weitere Umsetzung des Substrates mit einer Peptidzyklase ausreichend ist. Optional kann die Reinheit des Substrats anschließend mittels präparativer HPLC erhöht werden.

- 5 Enthält das lineare Peptid neben der C-terminalen freien COOH-Gruppe weitere freie COOH-Gruppen innerhalb der Peptidkette, wie beispielsweise COOH-Gruppen von Glutaminsäure und / oder Asparaginsäure, so müssen diese nicht C-terminalen freien COOH-Gruppen vor der Umsetzung des linearen Peptids mit einem Aktivierungsreagenz mit einer geeigneten orthogonalen Schutzgruppe geschützt werden, die nach Darstellung des erfindungsgemäßen Substrates wieder abgespalten werden muss. Geeignete Schutzgruppen und geeignete Methoden zu deren Entfernung sind dem Fachmann bekannt und können beispielsweise in Theodora W. Greene and Peter G. M. Wuts, „Protective groups in organic synthesis“, 2<sup>nd</sup> Edition 1991, John Wiley & Sons Inc., New York / Chichester / Brisbane / Toronto / Singapore nachgeschlagen werden.

- 20 Das gereinigte Substrat mit der erfindungsgemäßen Abgangsgruppe wird darauf mit der jeweiligen Peptidzyklase im Verhältnis 1 (Enzym) : 100 (Substrat) in 25 mM HEPES, 50 mM NaCl bei pH 7 und Raumtemperatur für 30-60 min inkubiert. Die Herstellung der HEPES-Lösung ist dem Fachmann bekannt und wurde in J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. I-III*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982, beschrieben. Die Identifizierung und Quantifizierung des Reaktionsproduktes erfolgt mittels analytischer HPLC.

- 30 Alternativ zum Aktivierungsreagenz DCC lassen sich die erfindungsgemäßen Substrate auch durch Umsetzung der Peptidsäure mit der jeweiligen Abgangsgruppe in Gegenwart anderer, den C-Terminus der Peptidsäure aktivierenden Reagenzien umsetzen. Entsprechungen sind bekannt und können, ohne den Schutzbe-

An.146/Mar/Sieb

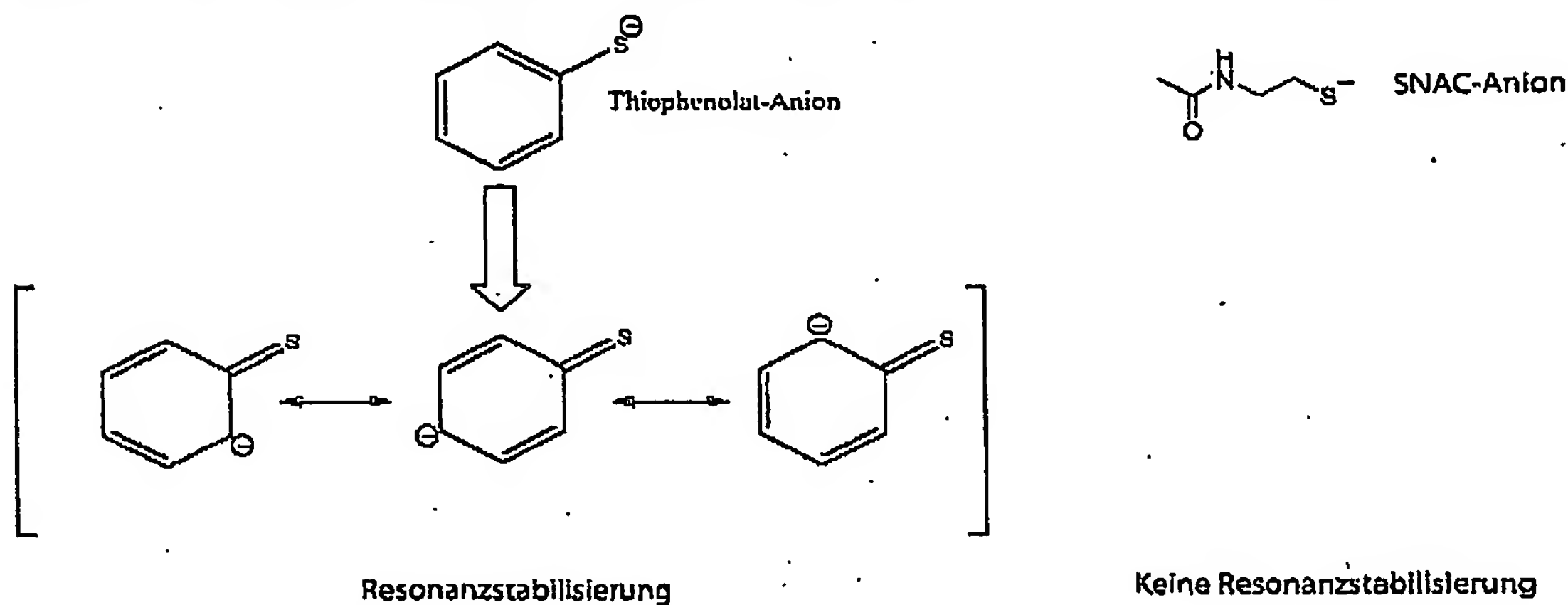
10/44

- reich der Patentansprüche zu verlassen, verwendet werden. Hierzu zählen beispielsweise die dem Fachmann bekannten Aktivierungsreagenzien DCI, PyClop, HBTU, HATU, HOSu, TBTU, T3P, BopCl und 3-Cl-1-Pyridiniumiodid. Als Kupplungsadditive sind neben dem oben aufgeführten HOBt beispielsweise auch die dem Fachmann bekannten Substanzen HOAt und HONB verwendbar. Dem Fachmann ist bekannt, dass diese Reaktionen zweckmäßig unter Zugabe einer Base wie beispielsweise DIPEA durchgeführt werden. Dem Fachmann sind weiterhin verschiedene Lösungsmittel zur Verwendung in den genannten Verfahren bekannt. Er kann diese Kombinationen von Aktivierungsreagenzien, Kupplungsadditiven, Basen und Lösungsmitteln mit seinem üblichen Wissen und der Standardliteratur selbst herstellen.
- 15 Als ladungsstabilisierte Abgangsgruppen werden bei der vorliegenden Erfindung chemische Verbindungen verstanden, die eine Thio- oder Hydroxyl-Gruppe besitzen und bei denen das freie Elektronenpaar des durch die Acylierungsreaktion freigesetzten Thiolat- oder Hydroxylat-Ions in Konjugation mit weiteren Elektronenpaaren von beispielsweise, aber nicht ausschließlich, C=C- oder C=N-Doppelbindungen steht oder bei der die Thio- oder Hydroxygruppe an ein Kohlenstoffatom gebunden ist, das seinerseits an einen aromatischen oder heteroaromatischen Ring gebunden ist. Solche Verbindungen sind z.B. Oxo- und Thio-aromatische und -heteroaromatische Verbindungen, aber auch ladungsstabilisierte aliphatische Oxo- und Thio- Abgangsgruppen. Diese Abgangsgruppen, wie z.B. Thiophenol, Phenol, 2,3,4,5,6-Pentafluorphenol, die Mercaptoanisol und Thioresole sowie 2-Hydroxypyridin und 2-Thio
- 30 pyridin funktionieren für die Acylierungsreaktion von Peptidzyklasen, die keinerlei Ähnlichkeit mit dem natürlichen Kofaktor besitzen, und weisen verbesserte Eigenschaften für *in vitro* Zyklisierungsreaktionen auf.

An.146/Mar/Sieb

Dies soll im Folgenden exemplarisch, aber nicht erschöpfend am Beispiel des Thiophenols erläutert werden:

Die Thiophenol-Abgangsgruppe weist bis auf die Thiolfunktion keine strukturelle Ähnlichkeit zum natürlichen 4'-Phospho-  
 5 panthethein-Kofaktor auf. Die Thiolfunktion ist direkt an einen aromatischen Phenylring gebunden. Dieses Strukturmerkmal verursacht die gegenüber den bisher beschriebenen Abgangsgruppen höhere Reaktivität dieser Verbindung. Beim  
 10 nukleophilen Angriff des aktivierten Ser (= Serin) der katalytischen Triade im aktiven Zentrum des Enzyms wird diese Abgangsgruppe als Thiophenolat-Ion freigesetzt. Die resultierende negative Ladung am Schwefelatom kann dabei sehr gut durch den angrenzenden Phenylring delokalisiert werden.



15

Eine derartige Erhöhung und Stabilisierung der Elektronendichte tritt bei den SNAC-, CoA- und Ppant-Abgangsgruppen nicht auf. Dort bleibt die negative Ladung am Schwefelatom lokalisiert. Da aber in der Regel die Güte einer Abgangsgruppe  
 20 proportional zu ihrer chemischen Stabilisierung ist, sind SNAC-, CoA- und Ppant chemisch betrachtet schlechtere Abgangsgruppen als Thiophenol.

Dem Fachmann ist bekannt, dass das Austrittsvermögen und damit die Qualität einer Abgangsgruppe von der Fähigkeit der  
 25 Abgangsgruppe abhängt, eine negative Ladung zu stabilisieren.

An.146/Mar/Sieb



Unter Stabilisierung einer Ladung versteht der Fachmann dabei das Verteilen von Ladungen oder Teilladungen auf mehrere Atome oder Bindungen, so dass diese Ladung oder Teilladung nicht an einem einzigen Atom oder an einer einzigen Bindung innerhalb eines Moleküls lokalisiert ist. Dabei sind dem Fachmann zwei verschiedene Möglichkeiten der Ladungsstabilisierung organischer Moleküle bekannt, die allgemein als mesomere oder Resonanz-Effekte (M-Effekte) und induktive Effekte (I-Effekte) bezeichnet werden. Unter einem mesomeren oder Resonanz-Effekt versteht der Fachmann das schnelle und reversible Verschieben von  $\pi$ -Elektronenpaaren, welches in Systemen auftritt, die konjugierte  $\pi$ -Bindungen besitzen. Dem Fachmann ist bekannt, dass der mesomere Effekt über große Entfernungen und damit viele Bindungen hinweg wirksam ist, wenn ein entsprechend ausgedehntes konjugiertes  $\pi$ -System vorliegt. In Ringverbindungen mit konjugierten  $\pi$ -Systemen nehmen auch Substituenten an der Mesomerie teil, sofern sie über freie  $\pi$ -Elektronenpaare verfügen oder diese aufnehmen können. Ist eine Ladung in einer substituierten Ringverbindung mit konjugiertem  $\pi$ -System und mesomeriefähigen Substituenten zu stabilisieren, so hängt es von der Position der Substituenten zueinander ab, ob und welche dieser Substituenten tatsächlich an der Ladungsstabilisierung durch Mesomerie teilnehmen. Dies ist dem Fachmann bekannt.

Besitzt ein Atom eine höhere Elektronegativität und damit eine stärkere Anziehung auf die Bindungselektronen als sein mit ihm über eine  $\sigma$ -Bindung verbundenes Nachbaratom, oder ist ein Atom mit weiteren Atomen oder Atomgruppen verbunden, die Elektronen ziehend wirken, so wird die Bindungselektronenwolke der hier betrachteten  $\sigma$ -Bindung in Richtung auf den Elektronenzug verschoben, d.h. polarisiert. Diese Polarisation einer  $\sigma$ -Bindung wird als Teilladung bezeichnet, da es sich hierbei um eine geringfügige Verschiebung von Elektronenwol-

An.146/Mar/Sieb

ken handelt und diese Verschiebung nicht zum Auftreten ganzzahliger Vielfacher der Elementarladung an einem bestimmten Atom führt. Die durch unterschiedliche Elektronegativitäten und / oder unterschiedlichen Elektronenzug von Atomen und Atomgruppen hervor gerufene Polarisierung von  $\sigma$ -Bindungen wird vom Fachmann auch als induktiver Effekt bezeichnet. Dem Fachmann ist bekannt, dass der induktive Effekt für einander benachbarte Bindungen am größten ist und mit zunehmender Entfernung zu dem Atom oder der Atomgruppe, das / die ihn hervor ruft, rasch abnimmt. Dies kann z.B. in Michael B. Smilth & Jerry March: *March's Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure. 5th Edition 2000, John Wiley & Sons Inc., New York / Chichester / Brisbane / Toronto / Singapore* nachgeschlagen werden.

Der Fachmann unterscheidet positive und negative mesomere bzw. induktive Effekte. Als positiv wird ein solcher Effekt bezeichnet, wenn er die Elektronendichte in Form einer Ladung oder Teilladung an einem Atom oder einer Atomgruppe erhöht (+M-Effekt, +I-Effekt), als negativ, wenn er die Elektronendichte verringert (-M-Effekt, -I-Effekt). Befinden sich beispielsweise an einem aromatischen System mehrere Substituenten, so üben sie ihre M- und I-Effekte unabhängig voneinander aus und können einander verstärkend, aber auch gegenläufig in Bezug auf die Ladungsstabilisierung an einem bestimmten Atom wirken. In der Regel wirken mesomere Effekte stärker als induktive.

In der vorliegenden Erfindung werden daher bevorzugt solche ladungsstabilisierten Abgangsgruppen gewählt, bei denen eine Hydroxy- oder Thiogruppe an eines der Ringatome eines aromatischen, heteroaromatischen oder araliphatischen Systems gebunden ist oder an ein Kohlenstoffatom, welches mit dem Ringsystem verbunden ist, wobei die chemische Struktur des aromatischen, heteroaromatischen oder araliphatischen Systems so gewählt ist, dass die Summe der mesomeren und induktiven

An.146/Mar/Sieb

Effekte der enthaltenen funktionellen Gruppen einen Elektronen-  
nenzug auf das Thiolat- oder Hydroxylat-Ion ausübt und auf  
diese Weise dessen negative Ladung stabilisiert.

- 5 Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Quantifizierung der  
Abgangsgruppenqualität ist der  $pK_A$ -Wert einer chemischen  
Verbindung: Je höher der  $pK_A$ -Wert, desto schlechter ist die  
jeweilige Abgangsgruppe. CoA, Ppant und SNAC haben  $pK_A$ -Werte  
von 10 - 11, während Thiophenol einen  $pK_A$ -Wert von 8 auf-  
10 weist. Es lässt sich somit sagen, dass Thiophenol seine  
mangelnde strukturelle Überstimmung zum natürlichen Phospho-  
panthethein-Kofaktor überraschend und im Widerspruch zum  
Stand der Technik durch seine hohe chemische Reaktivität  
überkompensieren kann, was auch für andere aromatische,  
15 heteroaromatische und ladungsstabilisierte araliphatische  
Thiol- und Hydroxyl-Verbindungen gilt. Dabei werden vorteil-  
haft solche ladungsstabilisierten aromatische, heteroaromati-  
sche und araliphatischen Thiol- und Hydroxyl-Verbindungen als  
Abgangsgruppen verwendet, deren  $pK_A$ -Wert kleiner oder gleich  
20 10, bevorzugt kleiner oder gleich 8 ist. Die Ringsysteme der  
erfindungsgemäßen aromatischen, heteroaromatischen und ara-  
liphatischen Thiol- und Hydroxyverbindungen können durch  
einen oder mehrere Substituenten mit positiven oder negativen  
induktiven oder mesomeren Effekte substituiert sein, wobei  
25 die Gesamtheit der Effekte aller vorhandenen Substituenten  
elektronenziehend und damit ladungsstabilisierend auf das bei  
der enzymatischen Zyklisierung frei gesetzte Thiolat- oder  
Hydroxylation wirkt.
- 30 Bei Verwendung von ladungsstabilisierten Thiol- und Hydroxy-  
verbindungen zeigen auch solche Enzyme Zyklisierungsaktivi-  
tät, die bei Verwendung der bisher bekannten Abgangsgruppen  
als inaktiv klassifiziert wurden (ca. 2/3 aller bisher unter-  
suchten). Enzyme, die auch bei Verwendung von SNAC als Ab-

An.146/Mar/Sieb

gangsgruppe zyklisieren, zeigen verbesserte kinetische Eigenschaften mit bis zu 15 fach gesteigerten  $k_{cat}/K_M$  Werten bei gleich bleibender Regio- und Stereoselektivität, wenn Thiophenol-Derivate an Stelle von SNAC-Abgangsgruppen verwendet werden. Dies konnte am Beispiel des Surfactin-Thiophenols gezeigt werden (siehe Fig. 4). Surfactin zeigt ebenfalls verbesserte Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Zyklisierung, wenn o-, m- oder p-Mercaptoanisol bzw. o-, m- oder p-Thiokresol als Abgangsgruppe verwendet werden.

10 Die Katalyse von Peptid-Zyklasen lässt sich in zwei Teilschritte zerlegen:

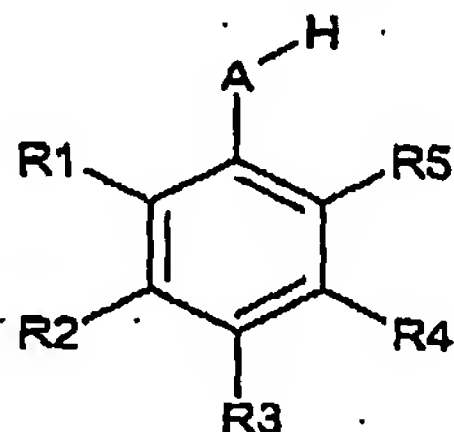
- Der erste Teilschritt ist die Ausbildung des Peptidyl-O-TE-Intermediates durch Acylierung des aktivierten Ser-Restes der katalytischen Triade.
- 15 - Der zweite Teilschritt ist die Deacylierung des Ser-Restes durch eine funktionelle Gruppe der gebundenen Peptidkette als internes Nukleophil.

Thioestergebundene Abgangsgruppen können ausschließlich die katalytische Effizienz des ersten Teilschrittes beeinflussen:

20 die Bildung des Peptidyl-O-TE-Intermediates. Experimente mit der neuen Abgangsgruppe Thiophenol bestätigen dies (siehe Fig. 4 bis Fig. 6). Eine Mutation im aktiven Zentrum des Enzyms zeigt keine Aktivität, was die abgangsgruppenbedingte Acylierung und darauffolgende enzymatische Zyklisierung

25 bestätigt.

Folgende aromatische, heteroaromatische und araliphatische Grundelemente dienen als ladungsstabilisierte Abgangsgruppen:



(I)

An.146/Mar/Sieb

mit

A = O, S und

sowie R1, R2, R3, R4 und R5, die unabhängig voneinander sein können:

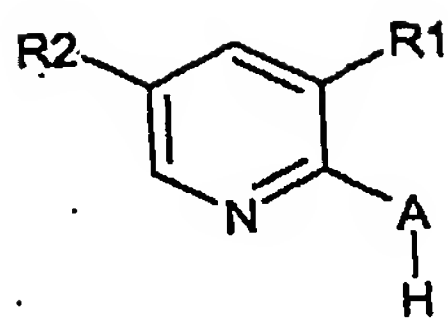
- 5 -NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

10 wobei

- L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis  
15 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Hetero-  
20 atome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der  
25 Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass bei Temperaturen unter 200 °C und Atmosphärendruck keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung bestehend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfindungsgemäßen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten  
30 werden,

An.146/Mar/Sieb





(II)

mit

A = O, S und

sowie R1 und R2, die unabhängig voneinander sein können:

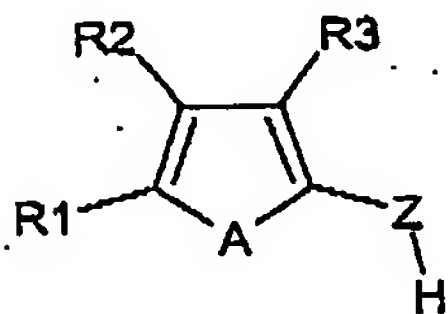
- NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>-</sup>, -  
 5 C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -  
 OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -  
 Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl,  
 -Heteroaryl,

wobei

- 10 L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Hetero-  
 alkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl  
 für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl  
 für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis  
 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear  
 15 oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für  
 eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die hetero-  
 cyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoff-  
 atomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Hetero-  
 atome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff,  
 20 Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aroma-  
 tischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl  
 für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis  
 zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der  
 Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt  
 25 sind, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass bei Tempe-  
 raturen unter 200 °C und Atmosphärendruck keine explosiven  
 Stoffe entstehen und die Verbindung bestehend aus linearen  
 Peptiden und daran gebundenen erfindungsgemäßen Abgangsgrup-  
 pen bei diesen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten  
 30 werden, wobei dem Fachmann bekannt ist, dass Substituenten an

An.146/Mar/Sieb

C-4 oder C-6 des Pyridinringes keine Ladungsstabilisierung des an C-2 befindlichen Hydroxy- oder Thiol-Substituenten bewirken,



(III)

mit

5 A = O, S, und

Z = O, S,

sowie R1, R2, und R3, die unabhängig voneinander sein können:

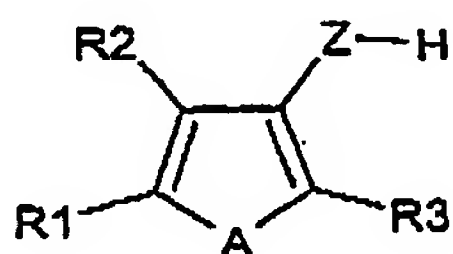
10 -NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

wobei

15 L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear  
20 oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff,  
25 Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt  
30 sind, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass bei Tempe-

An.146/Mar/Sieb

raturen unter 200 °C und Atmosphärendruck keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung bestehend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfindungsgemäßen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten werden,



(IV)

mit

A = O, S, und

Z = O, S,

10 sowie R1, R2, und R3, die unabhängig voneinander sein können: -NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl,

15 -Heteroaryl,

wobei

L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl

für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl

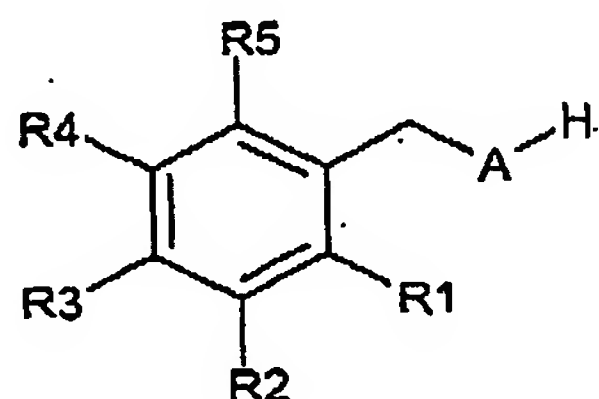
20 für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoff-

25 atomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis

30 zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt

An.146/Mar/Sieb

sind, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass bei Temperaturen unter 200 °C und Atmosphärendruck keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung bestehend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfindungsgemäßen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten werden,



mit

A = O, S und

10 sowie R1, R2, R3, R4 und R5, die unabhängig voneinander sein können;

-NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -

15 Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

wobei

L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl

20 für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die hetero-

25 cyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl

An.146/Mar/Sieb

21/44

für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass bei Temperaturen unter 200 °C und Atmosphärendruck keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung bestehend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfindungsgemäßen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten werden,

10

Des weiteren können diese Abgangsgruppen den natürlichen Kofaktor auch für andere artifizielle Reaktionen *in vitro* mit Enzymen der nichtribosomalen Peptidsynthetasen ersetzen. Eine solche Reaktion ist die Kondensationsreaktion zur Knüpfung einer Peptidbindung, katalysiert durch die Kondensationsdomäne (C-Domäne), die auch mit Thioester-gebundenen Substraten arbeitet.

15

Überraschend und im Widerspruch zum Stand der Technik wurde gefunden, dass die Erkennung eines Substrates durch das jeweilige Enzym keine Rolle spielt. Die vorliegende Erfindung stellt somit eine neue und für den Durchschnittsfachmann überraschende Weiterentwicklung des in der US 2002/0192773 A1 beschriebenen Verfahrens zur enzymatischen Herstellung makrozyklischer Moleküle dar, bei dem gereinigte isolierte Thioesterase-Domänen (TE-Domänen, Zyklasen) aus einem PKS- oder NRPS-Multidomänensystem mit einem Substrat umgesetzt werden. Bei den in Frage kommenden Substraten handelt es sich um lineare Peptide und Lipopeptide mit 5 - 22 monomeren Baueinheiten wie z.B. Aminosäuren. Substrate sind beispielsweise Fengycin, Mycosubtilin, Bacillibactin, CDA, Surfactin, Bacitracin oder Syringomycin und weitere Substrate, die bereits in US 2002/0192773 A1 beschrieben wurden, sowie Pristinamycin, wobei die genannten Substrate zusätzlich eine erfin-

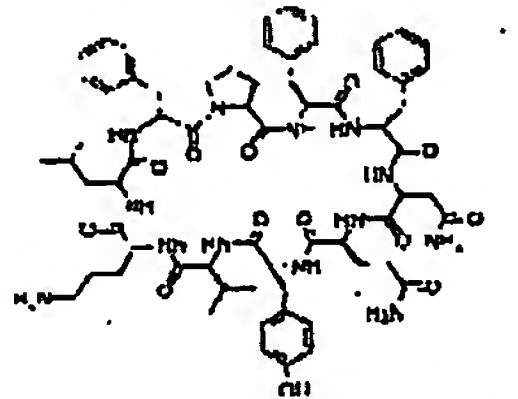
25

30

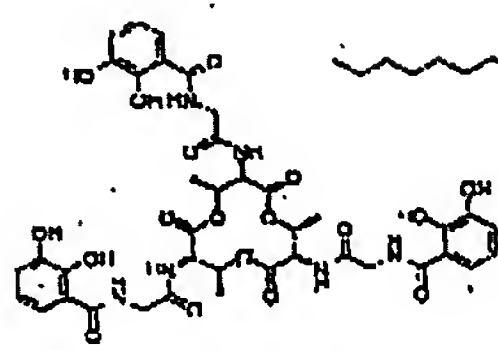
An.146/Mar/Sieb



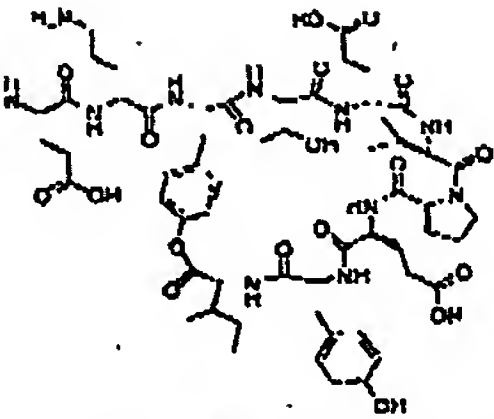
ungsgemäße Abgangsgruppe aufweisen. Einige dieser Substrate sind nachfolgend dargestellt:



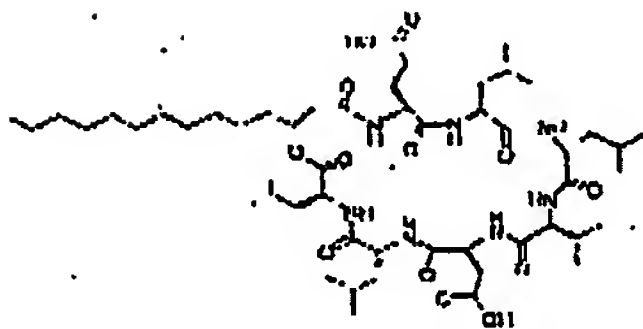
Tyrocidin (Antibiotikum)



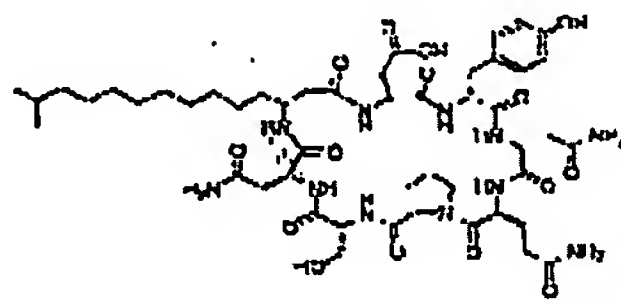
Bacillibactin (Siderophore)



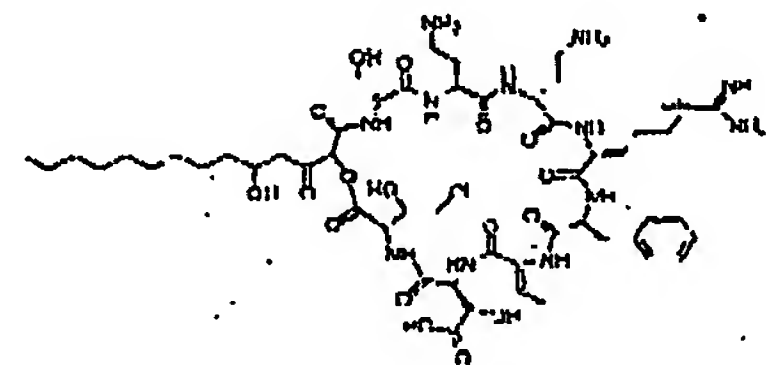
Fengycin (Antifungizid)



Surfactin (Surfactant)



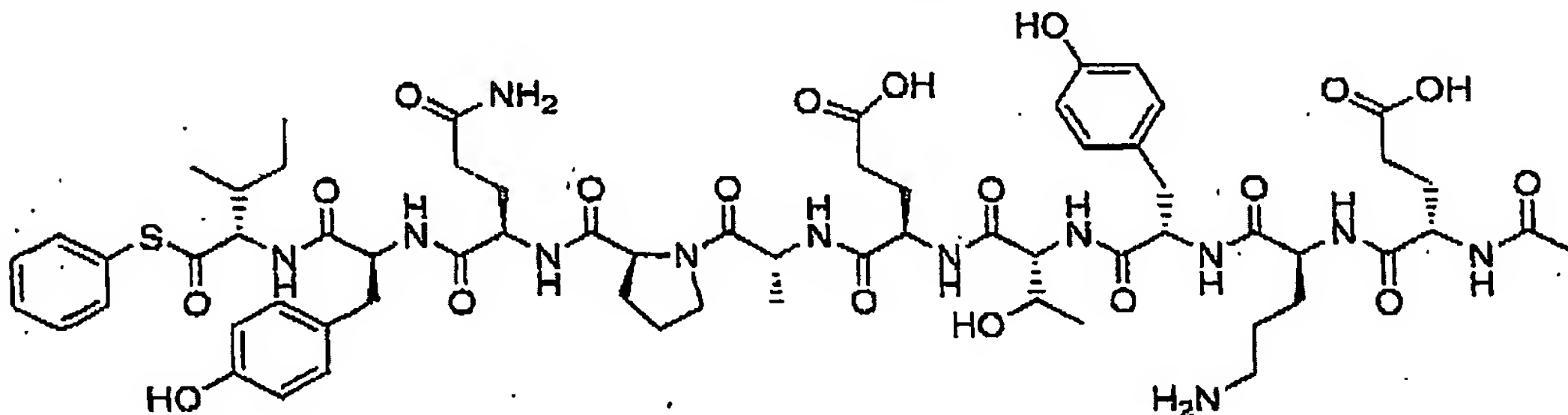
Mycosubtilin (Antifungizid)



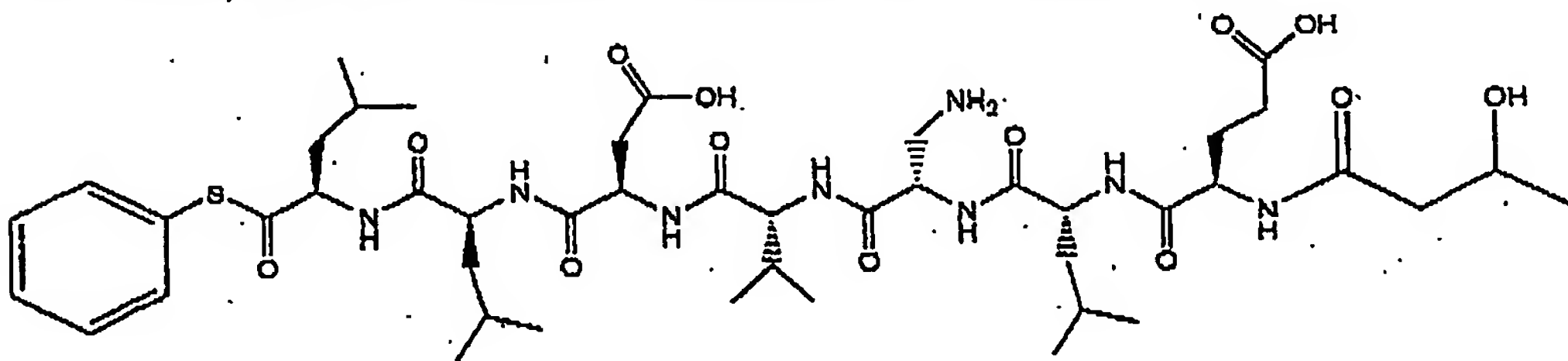
Syringomycin (Phytotoxin)

5

#### Bioaktive Peptide



Struktur eines Fengycin-Thiophenol Substrates



10 Struktur eines Surfactin-Thiophenol Substrates

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt im Vergleich zum Stand der Technik auch bei solchen linearen Peptiden eine Verbesse-

An.146/Mar/Sieb

rung dar, die bereits mit dem Fachmann bekannten Methoden zyklisiert werden konnten, da das erfindungsgemäße Verfahren die Reaktionsgeschwindigkeit der Zyklisierung beschleunigt und / oder zu höheren Ausbeuten des zyklischen Peptids führt.

5

Bei den in Frage kommenden Enzymen handelt es sich um gereinigte isolierte Thioesterase-Domänen oder Peptid-Zyklasen aus NRPS- oder PKS-Systemen, wie beispielsweise den entsprechenden Domänen bzw. Zyklasen von Fengycin, Mycosubtilin, Bacil-  
 10 libactin, CDA, Surfactin, Bacitracin, Syringomycin, Tyrocidin, Pristinamycin und allen übrigen in US 2002/0192773 A1 aufgeführten Peptid-Zyklasen, Thioesterasen und gereinigten isolierten Thioesterasen.

15 Das lineare Peptid enthält proteinogene und nicht-proteinogene Aminosäuren in seinem Rückgrat. Eingebettet in dieses Rückgrat können auch Reste und / oder funktionelle Gruppen sein, die sich nicht von Aminosäuren ableiten wie z.B. gesättigte oder ungesättigte Kohlenstoff-Spacer. Die  
 20 fakultativ in das Rückgrat eingebetteten Reste und /oder funktionellen Gruppen wurden bereits in US 2002/0192773 A1 beschrieben. Die erfindungsgemäße Abgangsgruppe wird dabei entweder an der C-terminalen Carbonsäuregruppe oder einer Seitenketten-Carbonsäure angebracht.

25

Die erfindungsgemäße Abgangsgruppentechnologie kann zur Herstellung von Stoffbibliotheken für zyklische Peptide und Proteine verwendet werden, indem neue Substratvarianten strukturell bedeutsamer Moleküle (beispielsweise Fengycin,  
 30 Mycosubtilin, Syringomycin, CDA, etc.), die bisher keine oder nur geringe Aktivität mit der herkömmlichen Abgangsgruppe SNAC zeigten, hergestellt und auf verbesserte biologische Eigenschaften (antibiotisch, antiviral, antifungal, cytostatisch) getestet werden. Die Substratvarianten werden durch

An.146/Mar/Sieb

kombinatorische Festphasenpeptidsynthese hergestellt und nach der oben aufgeführten allgemeinen Vorschrift mit den neuen Abgangsgruppen versehen. Bevorzugt wird dabei eine Stoffbibliothek für auf Zielzellen angepasste Peptidantibiotika hergestellt, wobei es sich um zyklische Peptidantibiotika handelt, die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellt wurden.

Das erfindungsmäße Verfahren kann zur Herstellung von Zyklisierungs-Kits verwendet werden, die Mittel zur Kopplung erfindungsgemäßer ladungsstabilisierter Abgangsgruppen sowie Peptidzyklasen bereit stellen, so dass lineare Peptide mit den bereit gestellten Abgangsgruppen zunächst zu erfindungsgemäßen Substraten und anschließend mit den bereit gestellten Peptidzyklasen zu zyklischen Peptiden umgesetzt werden können. Dem Hersteller des erfindungsgemäßen Kits ist aus seinem allgemeinen Wissen bekannt, wie er die einzelnen Komponenten des Kits, z.B. die Puffer, herstellt, formuliert und lagert.

Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten zyklischen Peptide und Proteine können als Arzneimittel für Patienten zur Therapie, Diagnostik und Prophylaxe von Erkrankungen verwendet werden, bei denen bakterielle und / oder virale Infektionen auftreten. Die erfindungsgemäßen zyklischen Peptide und Proteine können, sofern sie cytostatische und / oder immunsuppressive Eigenschaften besitzen, ferner als Arzneimittel für Patienten zur Therapie, Diagnostik und Prophylaxe von Tumorerkrankungen sowie in der Transplantationsmedizin verwendet werden. Der Begriff Patient bezieht sich dabei gleichermaßen auf Menschen und Wirbeltiere. Damit können die Arzneimittel in der Human- und Veterinärmedizin verwendet werden. Pharmazeutisch akzeptable Kompositionen von Verbindungen gemäß den Ansprüchen können als Di- bis Oligomere oder als deren Salze, Ester, Amide oder „Prodrugs“ vorlie-

An.146/Mar/Sieb

gen, sofern sie nach zuverlässiger medizinischer Beurteilung keine übermäßige Toxizität, Irritationen oder allergische Reaktionen am Patienten auslösen. Die therapeutisch wirksamen Verbindungen der vorliegenden Erfindung können dem Patienten  
5 als Teil einer pharmazeutisch akzeptablen Komposition entweder oral, rektal, parenteral, intravenös, intramuskulär, subkutan, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, intravasculär, intrathekal, intravesikal, topisch, lokal (Puder, Salbe oder Tropfen) oder in Sprayform (Aerosol)  
10 verabreicht werden. Die intravenöse, subkutane, intraperitoneale oder intrathekale Gabe kann dabei kontinuierlich mittels einer Pumpe oder Dosiereinheit erfolgen. Dosierungsformen für die örtliche Administration der erfindungsgemäßen Verbindungen schließen Salben, Puder, Zäpfchen, Sprays und  
15 Inhalationsmittel ein. Die aktive Komponente wird dabei unter sterilen Bedingungen mit einem physiologisch akzeptablen Trägerstoff und möglichen Konservativen, Puffern, Verdünnungs- und Treibmitteln je nach Bedarf vermischt.

20

An.146/Mar/Sieb

## [Beispiele]

Ausführungsbeispiel 1: Herstellung und Reinigung des Fengycin-Thiophenol-Substrates sowie Zyklisierung

- 5 Das lineare Fengycin-Substrat wird zunächst nach Standardmethoden der Peptidfestphasensynthese hergestellt. Die Peptidsequenz lautet: Acetyl-Glu-D-Orn-Tyr-D-Thr-Glu-D-Ala-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-COOH. Im nächsten Schritt werden 0,05 mMol des Peptides mit 0,1 mMol DCC, 0,1 mMol HOBt und 0,5 mMol Thiophenol versetzt und in 2 ml THF gelöst. Das Gemisch rührt für 30 min bei RT, und 0,05 mMol Kaliumkarbonat werden addiert. Das Gemisch rührt für weitere 2,5 h bei RT, und darauf wird durch Filtration festes DCH abgetrennt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Entschützung der
- 15 Peptidseitenketten erfolgt für 3 h in 2 ml 95% TFA, 2,5% Wasser und 2,5% Triisopropylsilan. Das Gemisch wird dann in 50 ml eiskalten Diethylether geschüttet und der entstehende Feststoff durch Zentrifugation abgetrennt. Die Reinigung des Feststoffs erfolgt mittels präparativer HPLC mit einer C<sub>18</sub>-Nucleodursäule (Porengröße 100 Å, Partikelgröße 7 µM, Durchmesser 10 mm, Länge 250 mm, Macherey-Nagel) mit einem Gradienten von 10% Acetonitril in Wasser/0,1 % TFA auf 70 % Acetonitril in Wasser/0,1% TFA in 40 min bei einer Flussrate von 6 ml/min. Die Retentionszeit des zyklisierten Fengycins
- 25 (vgl. Fig. 1) beträgt 19 min. Die Ausbeute beträgt zwischen 70 und 80 %.
- Die Produkte werden mit LC-MS und MALDI-TOF Massenspektrometrie auf Reinheit und Identität überprüft.

30 Ausführungsbeispiel 2: Herstellung und Reinigung des Fengycin-Benzylmercaptan-Substrates sowie Zyklisierung

Herstellung und Reinigung des Fengycin-Benzylmercaptan-Substrates erfolgten analog zu Ausführungsbeispiel 1, wobei in Ausführungsbeispiel 2 0,05 mMol Benzylmercaptan an Stelle

An.146/Mar/Sieb



von 0,05 mMol Thiophenol eingesetzt werden. Die Ausbeute des zyklisierten Fengomycins beträgt etwa 70 %.

Ausführungsbeispiel 3: Herstellung und Reinigung weiterer

5 Fengycin- Substrate sowie Zyklisierung

Fengycin wird wie unter Ausführungsbeispiel 1 und 2 beschrieben mit weiteren erfindungsgemäßen Abgangsgruppen umgesetzt. Dabei handelt es sich um 2-Mercaptopyridin, p-Nitrothiophenol  
10 und Pentafluorthiophenol. Die Zyklisierung dieser Fengycin-Substrate ergibt deutlich höhere Anteile an nicht enzymatisch katalysiertem Zyklisierungsprodukt bzw. hydrolysiertem Produkt als im Falle der Verwendung von Thiophenol bzw. Benzylmercaptan.

15

An.146/Mar/Sieb

**Tabelle 1.**

Die linearen Peptide Fengycin, Surfactin, CDA und Syringomycin werden wie unter Ausführungsbeispiel 1 beschrieben mit Thiophenol umgesetzt und anschließend enzymatisch zyklisiert.

- 5 Tab. 1 zeigt die Ergebnisse der massenspektrometrischen Messung der erhaltenen erfindungsgemäßen Substrate.

Verbindung	Spezies	Ionisations- methode	Beobachtete Masse (berechnete Masse) (Da)
Fengycin- Thiophenol	$[M+H]^+$	ESI	1361,40 (1361,60)
Surfactin- Thiophenol	$[M+H]^+$	ESI	965,40 (965,49)
CDA- Thiophenol	$[M+H]^+$	ESI	1519,30 (1519,5)
Syringomycin- Thiophenol	$[M+H]^+$	ESI	1175,60 (1175,54)

**[Abbildungslegenden]****Fig. 1: HPLC der Reaktion von Fengycin-Thiophenol mit der Fengycin-Peptidzyklase**

5 HPLC-MS mit einer reversed phase C<sub>18</sub> Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser:100 Å, Partikelgröße:3 µm) mit dem folgenden Gradienten: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C.  
10 1 zeigt die Kontrollreaktion mit einem mutierten (inaktivierten) Enzym. 2 zeigt die Inkubation mit dem nativen Enzym (aktiv). Su = Substrat, Cy = zyklisches Produkt, Hy = hydrolysiertes Produkt.

**Fig. 2: HPLC der Reaktion von Surfactin-Thiophenol mit der Surfactin-Peptidzyklase**

HPLC-MS mit einer reversed phase C<sub>18</sub> Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser:100 Å, Partikelgröße:3 µm)  
20 mit dem folgenden Gradienten: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C.  
1 zeigt die Kontrollreaktion ohne Enzym. 2 zeigt die Inkubation mit dem nativen Enzym (aktiv). Su = Substrat, Cy = zyklisches Produkt, Hy = hydrolysiertes Produkt, (Cy) nicht  
25 enzymatisch katalysierte Zyklisierung über eine Amino Seiten-  
gruppe in der Peptidsequenz an Position 3 (Dap).

**Fig. 3: Fengycin-Peptidzyklase**

5 µM der rekombinanten Fengycin-Peptidzyklase, die in vorher-  
30 gehenden Untersuchungen keine Zyklisierungsaktivität mit konventionellen SNAC-Substraten zeigte, wird mit 100 µM Fengycin-Thiophenol für 10, 30, 40, 50, 60 min bei Raumtemperatur in 25 mM HEPES, 50 mM NaCl bei pH 7 in 50 µL Gesamtvolumen inkubiert. Mit dieser Messung wird der lineare Bereich

An.146/Mar/Sieb

für weitere kinetische Studien ermittelt. Die Reaktionen werden durch Zugabe von 35 µL TFA (4 % in Wasser) gestoppt und auf der analytischen HPLC mit einer C<sub>18</sub>-Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser: 100 Å, Partikelgröße: 3 µm) mit dem folgenden Gradienten untersucht: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C.

Kinetische Untersuchungen werden zu verschiedenen Zeitpunkten bei Substrat-Konzentrationen von 50 µM bis 1000 µM durchgeführt und die kinetischen Größen  $K_M$  und  $k_{cat}$  aus der Lineweaver-Burk-Auftragung entnommen. Für Fengycin-Thiophenol ergibt sich für die Zyklisierungsreaktion ein  $K_M$  von 461 µM und ein  $k_{cat}$  von 0,33 min<sup>-1</sup>.

#### 15 Fig. 4: Surfactin-Peptidzyklase

Im Falle der Surfactin-Peptidzyklase existieren kinetische Referenzdaten mit einem SNAC-Substrat. Im Falle von Surfactin-Thiophenol wird für die Zyklisierungsreaktion ein  $K_M$  von 126 µM und ein  $k_{cat}$  von 5,6 min<sup>-1</sup> bestimmt, was einem  $k_{cat}/K_M$  Wert von 0,04 µM<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> entspricht. Verglichen damit ist die kinetische Effizienz von Surfactin-SNAC, repräsentiert durch den  $k_{cat}/K_M$  Wert 0,0029 µM<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, 14 mal niedriger als mit Surfactin-Thiophenol.

#### 25 Fig. 5: CDA-Peptidzyklase

Ein ähnliches Ergebnis erhält man für die Zyklisierung von CDA-Thiophenol mit der „Calcium Dependent Antibiotic“ Peptidzyklase (CDA). Der  $K_M$  Wert für das Thiophenol-Substrat beträgt 10,7 µM, und der  $k_{cat}$  Wert beläuft sich auf 0,21 min<sup>-1</sup>. Die kinetische Effizienz des Thiophenol-Substrates mit einem  $k_{cat}/K_M$  Wert von 0,02 µM<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> ist zehnfach größer verglichen mit dem  $k_{cat}/K_M$  Wert von dem SNAC Substrat ( $k_{cat}/K_M = 0,0021$  µM<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>).

An.146/Mar/Sieb

31/44

Fig. 6: Syringomycin-Peptidzyklase

Im Falle der Syringomycin-Peptidzyklase existieren keine kinetischen Referenzdaten mit einem SNAC-Substrat, da dies in vorhergehenden Experimenten keine Aktivität zeigte. Im Falle von Syringomycin-Thiophenol wird für die Zyklisierungsreaktion ein  $K_M$  von 32,9  $\mu M$  und ein  $k_{cat}$  von 0,805  $\text{min}^{-1}$  bestimmt, was einem  $k_{cat}/K_M$  Wert von 0,024  $\mu M^{-1} \text{min}^{-1}$  entspricht.

10 Fig. 7: HPLC der Reaktion von Surfactin-2-Thiokresol mit der Surfactin-Peptidzyklase

HPLC-MS mit einer reversed phase  $C_{18}$  Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser: 100 Å, Partikelgröße: 3  $\mu m$ ) mit dem folgenden Gradienten: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C. 1 zeigt die Kontrollreaktion mit einem mutierten (inaktivierten) Enzym. 2 zeigt die Inkubation mit dem nativen Enzym (aktiv). Su = Substrat, Cy = zyklisches Produkt, Hy = hydrolysiertes Produkt.

20

Fig. 8: HPLC der Reaktion von Surfactin-4-Methoxyphenylthiol mit der Surfactin-Peptidzyklase

25 HPLC-MS mit einer reversed phase  $C_{18}$  Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser: 100 Å, Partikelgröße: 3  $\mu m$ ) mit dem folgenden Gradienten: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C. 1 zeigt die Kontrollreaktion mit einem mutierten (inaktivierten) Enzym. 2 zeigt die Inkubation mit dem nativen Enzym (aktiv). Su = Substrat, Cy = zyklisches Produkt, Hy = hydrolysiertes Produkt.

30

An.146/Mar/Sieb

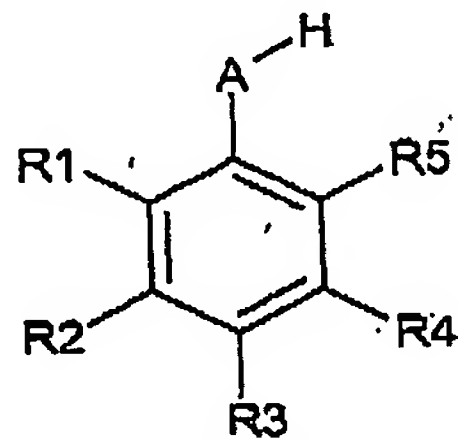


[Patentansprüche]

1. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide, bei dem
  - eine Peptidzyklase mit einem linearen Peptid in Kontakt  
5 gebracht wird,
  - das lineare Peptid einen Acylrest enthält, der durch  
eine chemisch mit diesem Acylrest verbundene nucleophile  
Abgangsgruppe aktiviert ist,
  - der aktivierte Acylrest des linearen Peptids das Zentrum  
10 der Peptidzyklase selektiv acyliert, wobei die nucle-  
ophile Abgangsgruppe unter Bildung des zyklischen Pep-  
tids abgespalten wird und
  - zyklische Peptide mit Ringen aus mindestens 5 Atomen  
gebildet werden,
  - 15 dadurch gekennzeichnet, dass
    - die nucleophile Abgangsgruppe, die mit dem Acylrest des  
linearen Peptids chemisch verbunden ist und diesen akt-  
viert, ladungsstabilisiert ist und
    - die ladungsstabilisierte Abgangsgruppe an die Acylgrup-  
20 pe der C-terminalen Carbonsäuregruppe des Peptids ge-  
bunden ist.
2. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide gemäß An-  
spruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den la-  
dungsstabilisierten Abgangsgruppen um aromatische, hetero-  
25 aromatische oder araliphatische Verbindungen handelt, bei  
denen eine Hydroxy- oder Thiogruppe an eines der Ringatome  
oder an ein an das Ringsystem gebundenes Kohlenstoffatom  
gebunden ist.
3. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem  
30 der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es  
sich bei der Peptidzyklase um eine NRPS- oder PKS-Zyklase  
handelt, bevorzugt um eine gereinigte isolierte Thioeste-  
rase-Domäne.

An.146/Mar/Sieb

4. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das lineare Peptid in seinem Rückgrat proteinogene und / oder nicht proteinogene Aminosäuren enthält, wobei in das Rückgrat auch Reste eingebettet sein können, die sich nicht von Aminosäuren ableiten.
- 5
5. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ladungsstabilisierten Abgangsgruppe um eine Verbindung der Formel
- 10



(I)

handelt, wobei gilt:

A = O, S

- 15 und wobei R1, R2, R3, R4 und R5 unabhängig voneinander sein können:

-NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -

- 20 Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

wobei

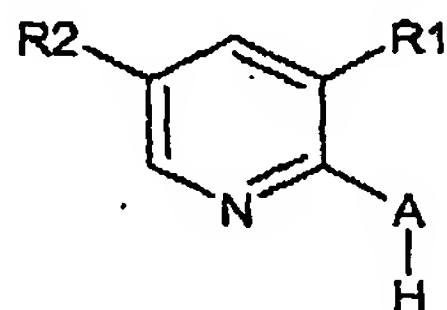
L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl

- 25 für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die hetero-

An.146/Mar/Sieb

cyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind.

- 10 6. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ladungsstabilisierten Abgangsgruppe um eine Verbindung der Formel



(II)

15

handelt, wobei gilt:

A = O, S

und wobei R1 und R2 unabhängig voneinander sein können:

- NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>, -  
 20 C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -  
 OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -  
 Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl,  
 -Heteroaryl,

wobei

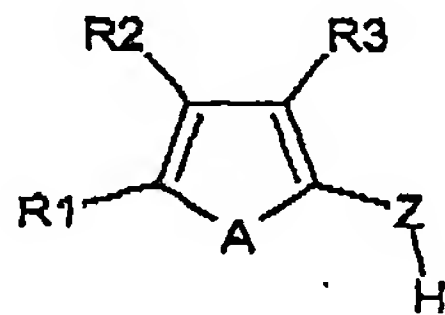
- 25 L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl; -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear  
 30 oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für

An.146/Mar/Sieb

35/44

eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind.

7. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ladungstabilisierten Abgangsgruppe um eine Verbindung der Formel



(III)

handelt, wobei gilt:

A = O, S und

20 Z = O, S,

und wobei R1, R2, und R3 unabhängig voneinander sein können:

-NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>, -

C(-O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -

OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -

25 Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

wobei

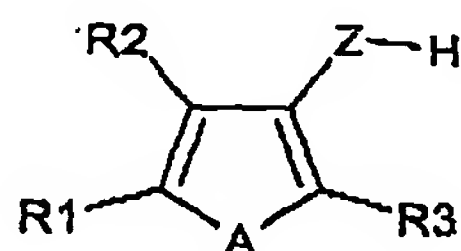
L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl

30 für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl

An.146/Mar/Sieb

für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die hetero-  
 5 cyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl  
 10 für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind.

15 8. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ladungsstabilisierten Abgangsgruppe um eine Verbindung der Formel



(IV)

20

handelt, wobei gilt:

A = O, S und

Z = O, S,

und wobei R1, R2, und R3 unabhängig voneinander sein können:

25 -NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

30 wobei

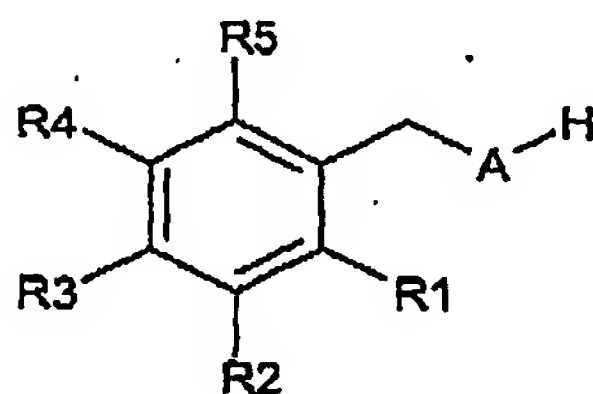
An.146/Mar/Sieb



37/44

1, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Hetero-  
 alkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl  
 für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl  
 für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis  
 5 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear  
 oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für  
 eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die hetero-  
 cyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoff-  
 10 atome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff,  
 Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aroma-  
 tischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl  
 für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis  
 zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der  
 15 Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt  
 sind.

9. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem  
 der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass es  
 20 sich bei der ladungsstabilisierten Abgangsgruppe um eine  
 Verbindung der Formel



(V)

handelt, wobei gilt:

25 A = O, S

und wobei R1, R2, R3, R4 und R5 unabhängig voneinander sein  
 können:

-NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>2</sub><sup>1</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>,  
 -C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -

An.146/Mar/Sieb

OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

wobei

- 5 L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear  
10 oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff,  
15 Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt  
20 sind.
10. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschließende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu einem zyklischen Peptid, wobei die Substrate lineare Peptide sind, dadurch gekennzeichnet, dass nacheinander folgende Schritte ausgeführt werden:
- 25
- Versetzen der freien Peptidsäure mit einem den C-Terminus der Peptidsäure aktivierenden Reagenz, einem Kupplungsadditiv und einer ladungsstabilisierten Abgangsgruppe in einem Lösungsmittel  
30
  - Rühren bei Raumtemperatur;
  - Zugabe einer Base und weiteres Rühren bei Raumtemperatur,
  - Filtrieren,

An.146/Mar/Sieb

- Entfernen des Lösungsmittels,
- Entschützen des Peptids,
- Zugabe einer Peptid-Zyklase,
- Reinigung des erhaltenen zyklischen Peptids.

- 5 11. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschließende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu einem zyklischen Peptid gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Acylgruppe der C-terminalen Aminosäure des linearen Peptids an eine Abgangsgruppe nach einem der
- 10 Ansprüche 5 bis 9 gebunden ist.
12. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschließende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu einem zyklischen Peptid gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Abgangsgruppe einen  $pK_A$ -Wert kleiner
- 15 oder gleich 10, bevorzugt kleiner oder gleich 8 besitzt.
13. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschließende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu einem zyklischen Peptid gemäß nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass als Aktivierungsre-
- 20 gonz für den freien C-Terminus oder eine Seitenketten-Carbonsäure der Peptidcarbonsäure DCC, DCI, PyClop, HBTU, HATU, HOSu, TBTU, T3P, BopCl oder 3-Cl-1-Pyridiniumiodid verwendet wird.
14. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschließende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu einem zyklischen Peptid gemäß einem der Ansprüche 10 bis
- 25 13, dadurch gekennzeichnet, dass als Kupplungsadditiv HOBt, HOAt oder HONB verwendet wird.
15. Verwendung von zyklischen Peptiden gemäß einem der
- 30 Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung eines Medikamentes zur Therapie, Diagnostik und Prophylaxe von Erkrankungen, bei denen bakterielle Infektionen auftreten.

An.146/Mar/Sieb

16. Verwendung von zyklischen Peptiden gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung eines Kits für die Herstellung zyklischer Peptide.

An.146/Mar/Sieb

[Zeichnungen]

Fig. 1:

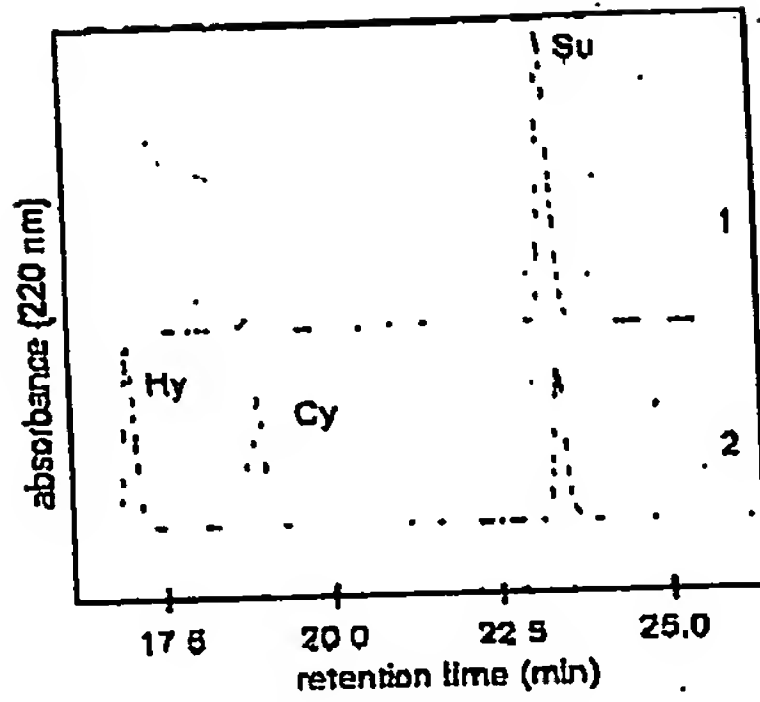


Fig. 2:

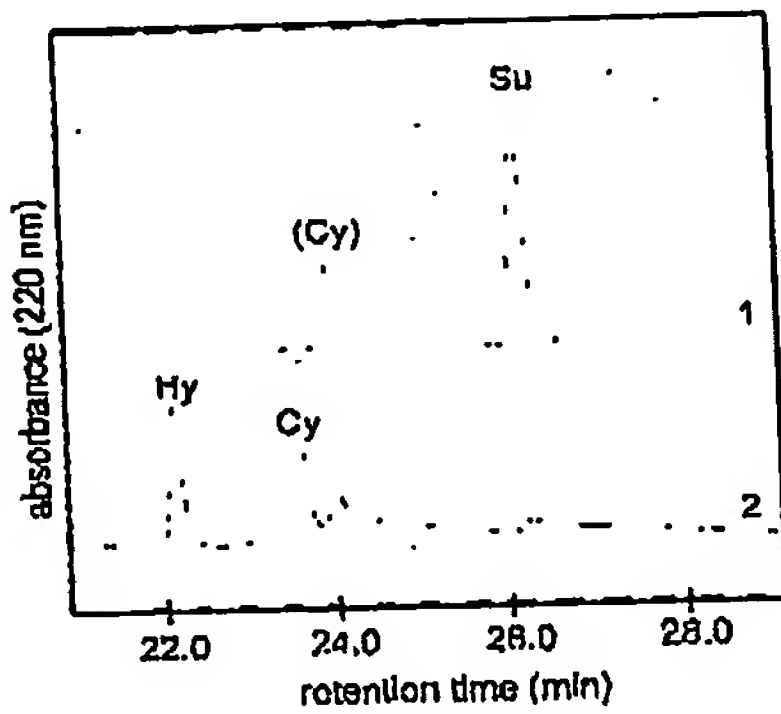


Fig. 3:

Lineweaver-Burk Plot von Fengycin-Thiophenol  
Zyklisierung

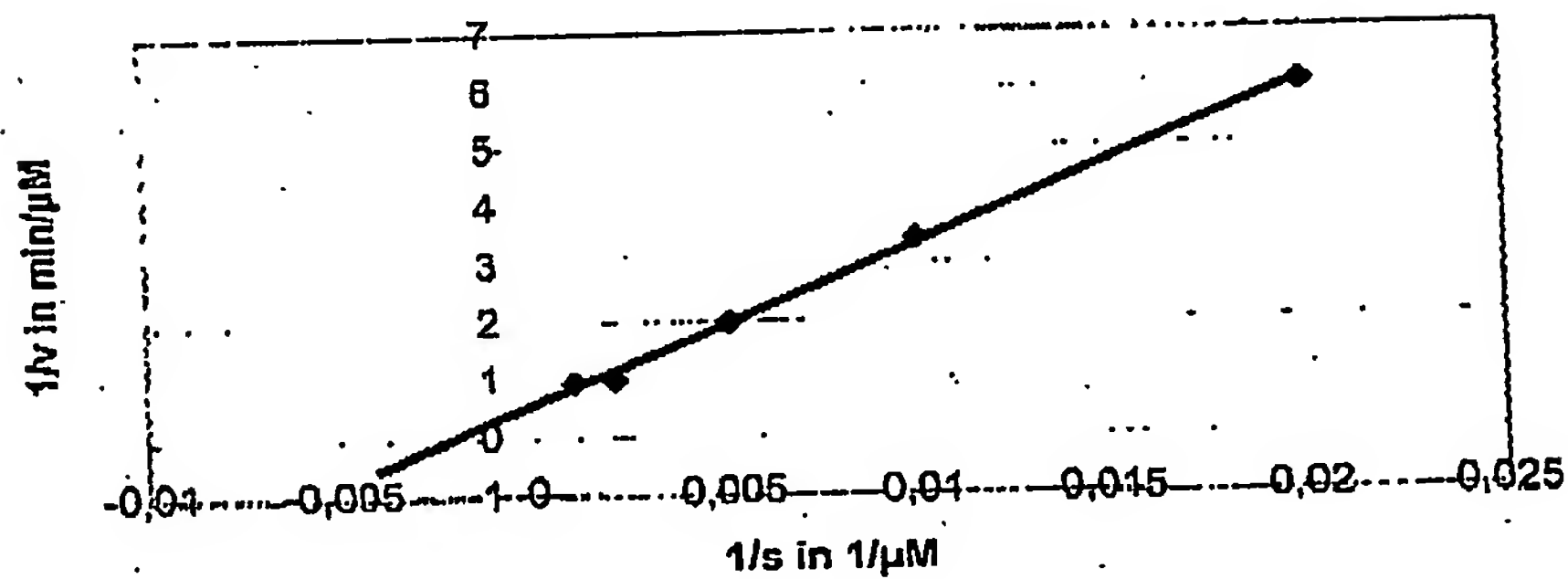
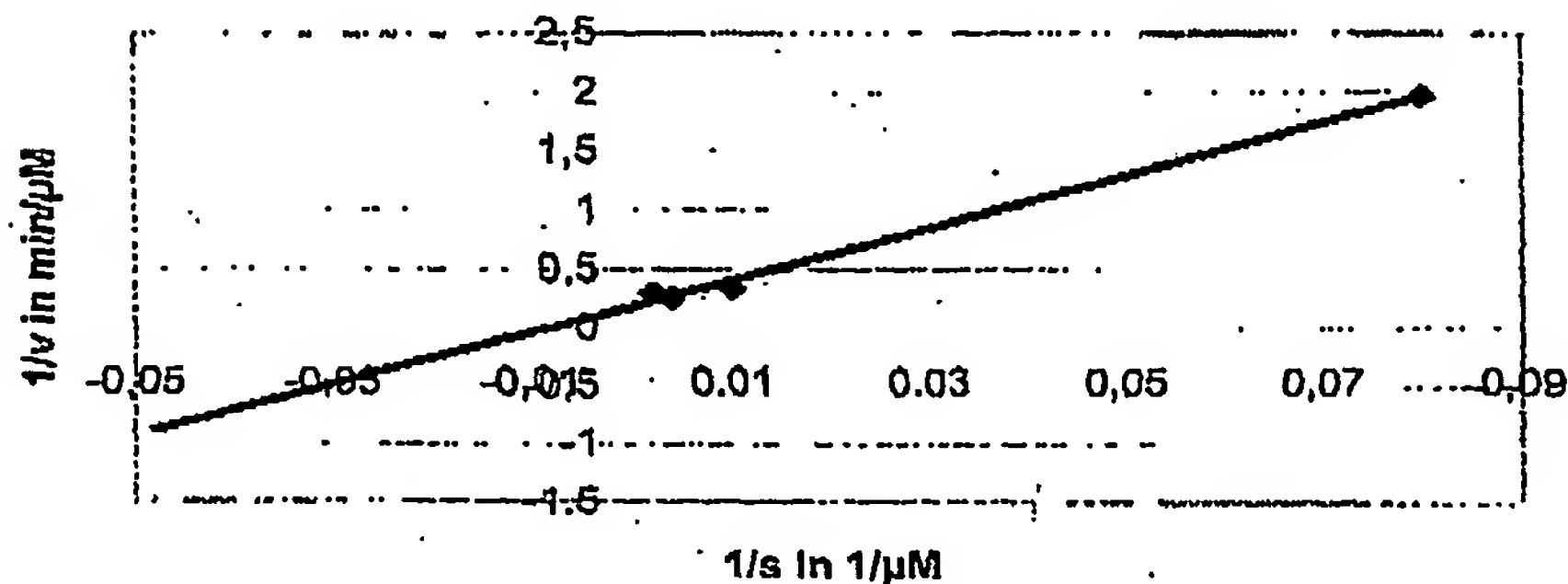




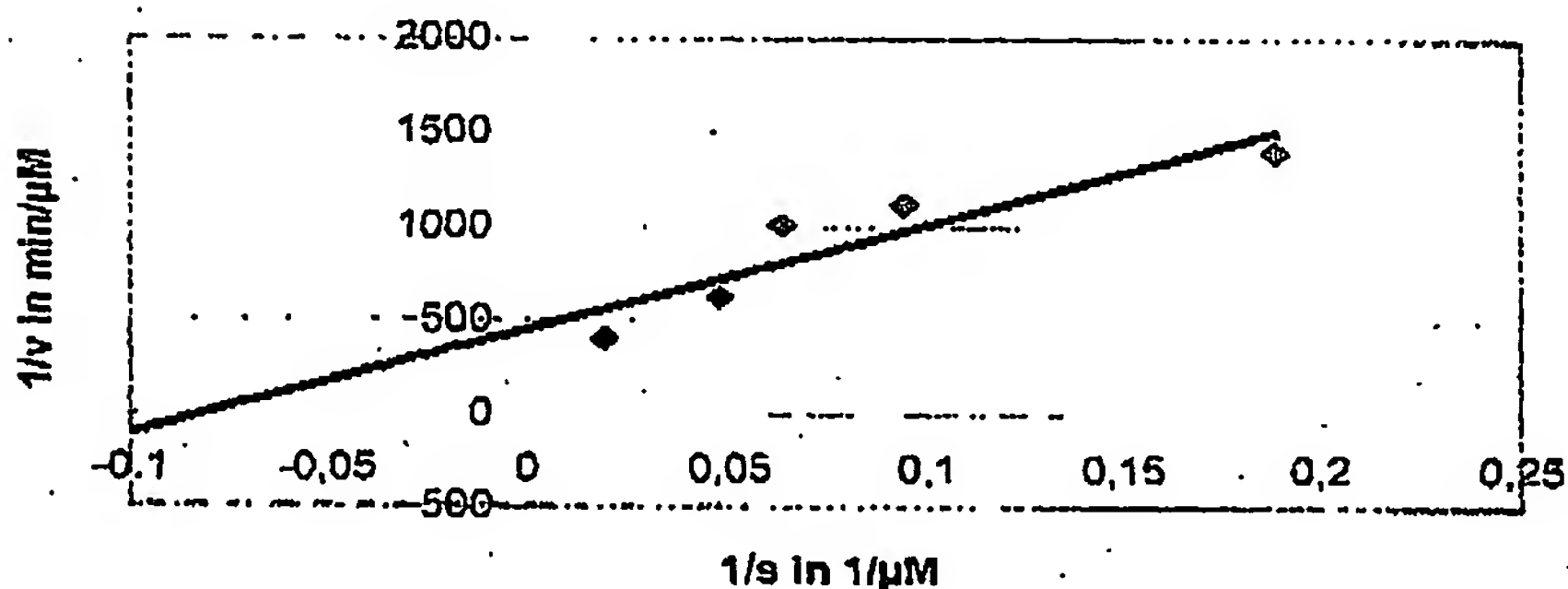
Fig. 4:

**Lineweaver-Burk Plot von Surfactin-Thiophenol  
Zyklisierung**



5 Fig. 5:

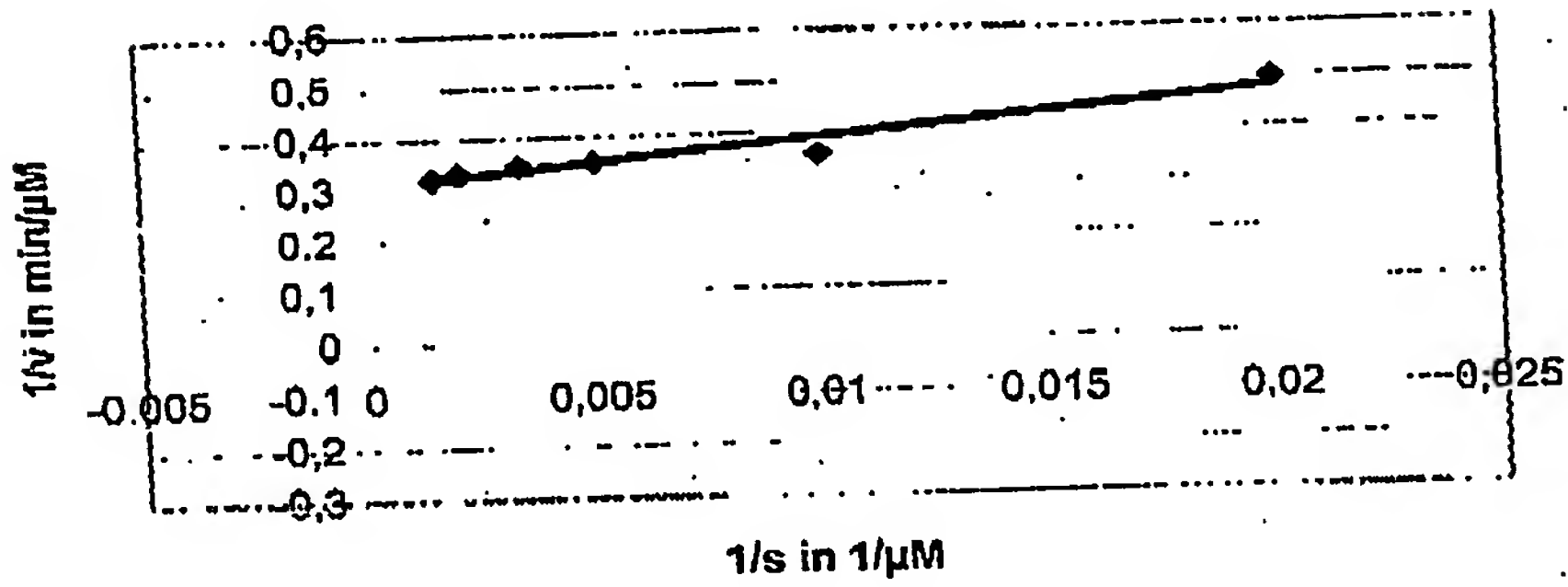
**Lineweaver-Burk Plot von CDA-Thiophenol  
Zyklisierung**



An.146/Mar/Sieb

Fig. 6:

Lineweaver-Burk Plot von Syringomycin-Thiophenol  
Zyklisierung



5 Fig. 7:

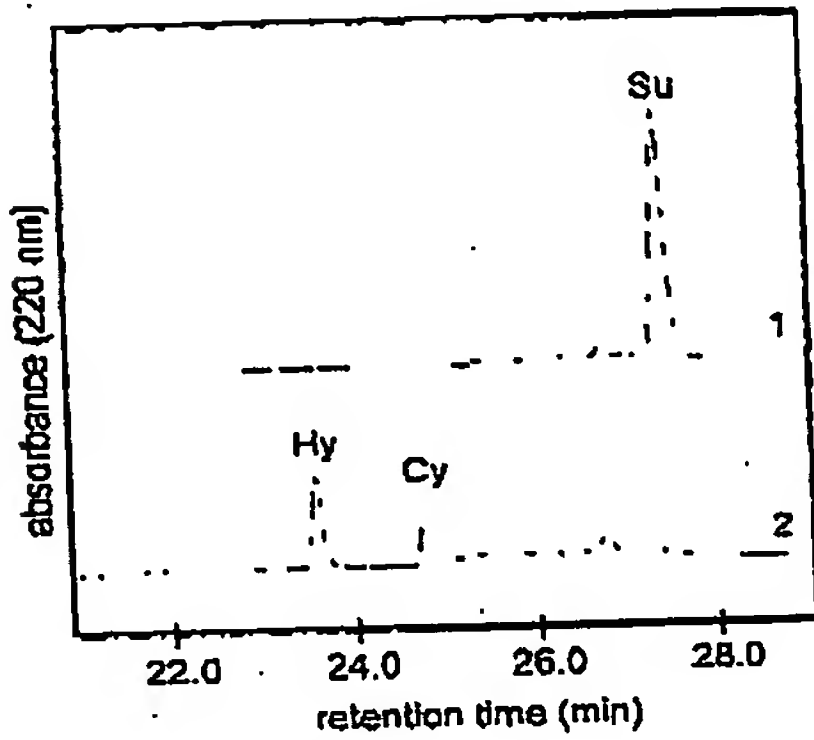
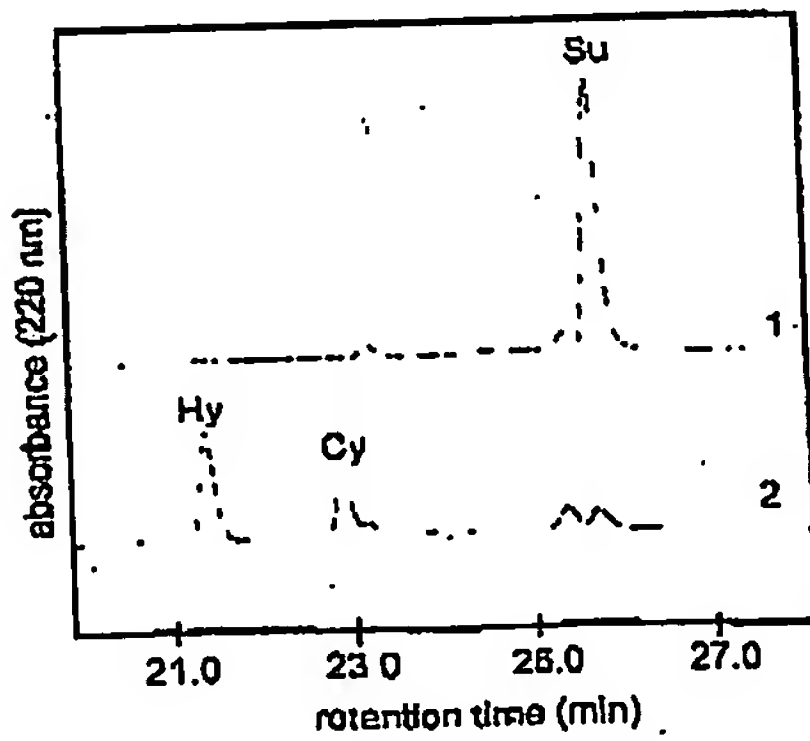


Fig. 8:



An.146/Mar/Sieb

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**